海洋链霉菌 *Streptomyces sporoverrucosus* 33510 次级代谢产物研究

摘要：为获得海洋放线菌次级代谢产物中的活性物质，对海洋链霉菌 *Streptomyces sporoverrucosus* 33510 进行研究。对 *Streptomyces sporoverrucosus* 33510 菌株进行抑菌活性检测，结果表明菌株 *Streptomyces sporoverrucosu* 33510 对多种植物致病菌有抑制活性。使用高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography，HPLC）、半制备液相色谱（Semi-pre HPLC）、柱色谱（Colume Chromatography，CC）、薄层色谱（Thin Layer Chromatography，TLC）、重结晶等分析及分离技术对其发酵产物进行分离纯化。通过核磁共振（Nuclear Megnetic Resonance，NMR）对得到的单体化合物进行鉴定。从其次级代谢产物中共分离得到 10 个单体化合物：bisphenol A（**1**），2-(4-methoxyphenyl)acetic acid（**2**），N-phenethylacetamide（**3**），methyl 2-(1H-indol-3-yl)acetate（**4**），dibutyl phthalate（**5**），cyclo(D)-pro-(D)-Leu（**6**），cyclo(D-Pro-L-Leu)（**7**），cyclo-(D-ProL-Ile)（**8**），cyclo(L-Pro-L-Phe)（**9**），cyclo-(L-Leu-L-Val)（**10**）。除了化合物 **5** 和 **9**，其余 8 个化合物均为首次从该菌中分离得到。对单体化合物的抑菌结果表明化合物 **3**，**4**，**5**，**6** 对立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani*）有明显抑制效果；化合物 **7**，**8**，**9** 对板栗疫病菌（*Cryphonectria parasitica*）有明显抑制效果；化合物 **3**，**7** 对假禾谷镰刀菌（*Fusarium pseudograminearum*）有明显抑制效果。菌株 *Streptomyces sporoverrucosus* 33510 具有作为抑菌药物的开发潜力。

关键词：*Streptomyces sporoverrucosus* 33510；次级代谢产物；抑菌活性

Study on Secondary Metabolites of Marine *Streptomyces Sporoverrucosus* 33510

Abstract: To study active secondary metabolites of marine actinobacteria *Streptomyces sporoverrucosus* 33510, and evaluate antibacterial activity of the purified compounds. The *Streptomyces sporoverrucosus* 33510 strain was tested for antibacterial activity. *Streptomyces sporoverrucosu* 33510 shows strong inhibitory activity against various plant pathogenic bacteria. The compounds were isolated and purified by high performance liquid chromatography (HPLC), semi-pre HPLC, thin-layer chromatography (TLC) and resortification technology. And their chemical structures were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. The chemical structures were identified as bisphenol A (**1**), 2-(4-methoxyphenyl)acetic acid (**2**), N-phenethylacetamide (**3**), methyl 2-(1H-indol-3-yl)acetate (**4**), dibutyl phthalate (**5**), cyclo(D)-pro-(D)-Leu (**6**), cyclo(D-Pro-L-Leu) (**7**), cyclo-(D-ProL-Ile) (**8**), cyclo(L-Pro-L-Phe) (**9**), cyclo-(L-Leu-L-Val) (**10**). Except for the compounds **5** and **9**, the remaining eight compounds were isolated from *Streptomyces sporoverrucosus* for the first time. The antibacterial activity of the compounds were tested for by Disk Diffusion Assay. Compound **3**, **4**, **5**, and **6** show antibacterial activity against *Rhizoctonia solani*. Compound **7**, **8**, and **9** show antibacterial activity against *Cryphonectria parasitica*. Compound **3** and **7** show antibacterial activity against *Fusarium pseudograminearum*. Marine actinomycetes *Streptomyces sporoverrucosus* 33510 can be a potential resource for antibacterial drugs.

Key words: *Streptomyces sporoverrucosus* 33510; secondary metabolites; antibacterial activity

---

收稿日期： - - ; **修订日期：** - - 。 编辑
基金项目：国家自然科学基金资助项目（81960164）; 广西科技重大项目（AB21196020）
作者简介：刘颖(1997—), 女, 硕士研究生, 从事天然药物化学研究。email: liuyinghealer@163.com
通信作者：杨立芳。email: yanglf1990@163.com
Received date: --; **Revised date:** --. Editor:
Foundation item: Science and Technology Major Project of Guangxi (AB21196020); Science and Technology Major Project of Guangxi (AB21196020)
Corresponding author: YANG Lifang. email: yanglf1990@163.com

在陆地环境中寻找能产生有效成分的微生物逐渐受限，人们开始把目光投入到海洋环境中。20 世纪60 年代末，随着探索领域扩展到海洋中的动植物，新次级代谢产物的研究迈进了一个新的方向。如今，经过广泛探索，海洋天然产物的研究被认为既是天然产物化学的重要组成部分，又是药物发现及开发的重要来源(Jensen, et al. 1994)。

目前人们认识的有活性的代谢物有 22000 多种，其中的 10100 多种都是由放线菌产生的(Jiang, et al. 2007)。链霉菌属放线菌仍然是新化合物的主要来源，2017 年报道了 137 种代谢物，其中一半以上的数量是海洋来源链霉属的代谢物，其次是亲缘关系最近的芽孢杆菌、诺卡氏菌和假单胞菌，分别有 14、15 和 16 个新化合物(Blunt, et al. 2021)。目前临床应用的抗生素约2/3 来源于链霉菌属(Bi, et al. 2016)。

本研究对来源于广西茅尾海红树林根际土壤的链霉菌 *Streptomyces sporoverrucosus* 33510 进行抑菌活性检测，并对其次级代谢产物进行分离纯化，以期获得抑菌活性好的化合物。

1. 仪器试剂与材料

1.1 仪器

低温冷却液循环泵（LC-LTC-10/20，上海力辰邦西仪器科技有限公司）；旋转蒸发仪（N-1300，上海爱朗仪器有限公司制造）；循环水真空泵（SHZ-Ⅲ，上海亚荣生化仪器厂）；数显恒温水浴锅（HH-S6，金坛市医疗仪器厂）；生化培养箱（ZXSD-B1160，上海智城分析仪器制造有限公司）；超净工作（ZHJH-C1112B，上海智城分析仪器制造有限公司）；大容量落地式振（MQZ-632，上海旻泉仪器有限公司）；电子天平（ME204T，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司）；半制备高效液相色谱仪（SCL-10AVP，岛津（日本））；高效液相色谱仪（LC-10AT，岛津（日本））；核磁共振波谱仪（Bruker（400 MHz）；布鲁克拜厄斯宾有限公司）

1.2 试剂

石油醚，乙酸乙酯，甲醇，二氯甲烷等有机试剂购自成都市科隆化学品有限公司（过柱使用有机试剂均为分析纯，液相使用有机试剂均为色谱纯。）

1.3 材料

马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA，青岛高科技工业园海博生物技术有限公司）；放线菌菌株取自广西民族大学海洋与生物技术学院的菌种库，病原菌真菌源自云南大学云南省微生物研究所及广西农业科学院。

2. 方法

2.1 抑菌活性检测

样品处理：用甲醇/二氯甲烷溶解化合物，制成 0.1 mg·mL^{-1} 的样品，分两次吸取 5 μL 样品（共 10 μL）于事先用打孔器打好并灭菌的 8 mm 滤纸片上，待有机试剂挥干、药液完全吸收后，用灭过菌的镊子夹取滤纸片放到培养基平板上。阳性药为酮康唑（0.1 mg·mL^{-1}），空白对照为甲醇/二氯甲烷溶液。

对植物致病菌的抑菌活性检测：用灭过菌的 1 mL 枪头挑取 8 mm 带有指示菌的琼脂块圆饼放到另一个新的 PDA 固体培养基的中央，用灭菌后的竹签挑取实验菌株单菌落放到距指示菌 2 mm 位置，依次做好标记及封口，28℃正置培养 3 天，观察抑菌情况。

2.2 粗提物的获得

将本课题组批量发酵得到的 180 L 发酵液用等体积乙酸乙酯萃取三次，减压浓缩萃取液得到 24.9 g 浸膏粗提物。

2.3 次级代谢产物的分离纯化

采取干法装柱、干法上样的方式，经正相硅胶柱洗脱分离。洗脱剂及比例为：石油醚/乙酸乙酯（1/0、10/1、8/1、6/1、4/1、2/1、1/1、1/2、0/1），共得到 27 个组分，其中第二十个组分通过重结晶纯化得到化合物 **1**（11 mg）。经 HPLC 分析后合并相同物质组分，共得到 11 个组分 Fr.1-11。薄层色谱硅胶（200-300、300-400 目）购自青岛海洋化工有限公司；ODS 柱色谱填料：YMC Gel ODS-A；分析色谱柱：YMC HPLC column（250×4.6 mmL.D., S-5 μm, 12 nm, AA12S05-2510WT）；半制备色谱柱：YMC-Pack ODS-A（250×10 mmL.D.，S-5μm，12nm，AA12S05-2510WT）。

组分 Fr.5 的分离：使用 ODS 反相柱色谱，以甲醇/水 20%-80% 依次洗脱，共得到 21 个组分 Fr.5.1-Fr.5.21，经 HPLC 分析后合并 Fr.5.10 与 Fr.5.11，通过 Semi-pre-HPLC 以体积分数 70% 甲醇/水进行洗脱得到化合物 **2**（1.8 mg）。

组分 Fr.7 的分离：使用 ODS 反相色谱，以甲醇/水 10%-80% 依次洗脱，共得到 24 个组分 Fr.7.1-Fr.7.1.25。其中 Fr.7.8 经 HPLC 分析后通过 Semi-pre-HPLC 以 30% 甲醇/水洗脱得到化合物 **3**（4.6 mg）与 **4**（18.7 mg）。组分 Fr.7.11 和 Fr.7.20 经 HPLC 分析确定制备条件分别为 50%甲醇、264 nm 以及 45%甲醇、267nm，经半制备液相分别制得化合物 **5**（2.2 mg）与化合物 **6**（11 mg）。

组分 Fr.11 通过 Semi-pre-HPLC，以体积分数 30 % 甲醇/水洗脱得到 4 个单体化合物 **7**（36.2 mg）、化合物 **8**（26.2 mg）、化合物 **9**（13.4 mg）及化合物 **10**（55.2 mg）

所有 Semi-pre-HPLC 流速均为 3.5 mL/min，洗脱程序见表 1。

表 1 HPLC 洗脱程序

Tab.1 HPLC elution procedures

Time/min	Methanol/%	Water/%
0.01	10	90
5	10	90
15	100	0
20	100	0
25	10	90

3. 结果与讨论

3.1 S.33510 的抑菌结果

S.33510 的抑菌实验表明其对多种植物致病菌有明显的抑制效果。部分效果如图 1，详细结果见表 2：

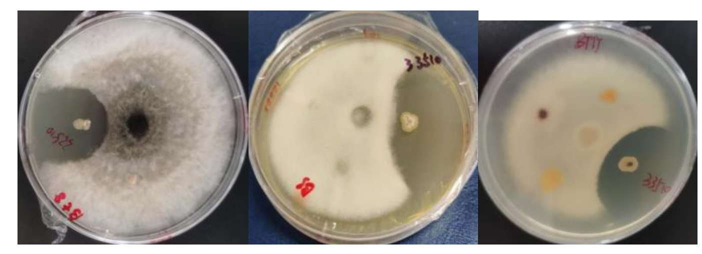


图1 *S*.33510 的抑菌效果

图中从左到右依次是葡萄座腔菌、小麦平脐蠕孢菌、芭蕉炭疽菌。

Fig.1 The antibacterial efficacy of *S*.33510

From left to right, it is followed by *Botryosphaeria dothidea*, *Bipolaris sorokiniana*, *Colletotrichum musae*.

表 2 *S*.33510 菌株对不同致病菌的抑制结果

Tab.2 Results of *S*. 33510 strains against different pathogenic bacteria

Fusarium oxysporum	*Fusarium pseudograminearum*	*Colletotrichum musae*	*Bacillus subtilis*	*Plectosphaerella cucumerina*	*Cryphonectria parasitica*	*Botryosphaeria dothidea*
√	√	√	√	×	×	√

注：“√”表示抗菌效果明显，“×”表示无明显抗菌效果。

Note: "√" indicates an obvious antibacterial effect, and "×" means no obvious antibacterial effect

3.2 单体化合物的结构鉴定

化合物 **1**：透明片状晶体。^{1}H NMR（400 MHz，Methanol-d_4）δ 4.26（ddd，*J* = 9.5，7.2，1.8 Hz，1H），4.17-4.09（m，1H），3.55-3.47（m，2H），2.31（dddd，*J* =

11.3，6.9，4.6，2.9 Hz，1H），2.10-1.82（m，5H），1.57-1.47（m，1H），0.96（dd，J = 6.4，2.6 Hz，6H）。^{13}C NMR（101 MHz，MeOD）δ 172.80，168.92，60.28，54.62，46.44，39.39，29.07，25.76，23.66，23.30，22.20。经比对，以上数据与文献(刘涛, et al. 2012)报道一致，名为 cyclo-(S-Pro-S-Leu)，为已知化合物。

化合物 **2**：深黄色油状物质，溶解于甲醇。^{1}H NMR（400 MHz，Methanol-d_4）δ 7.02 (d，J = 8.7 Hz，1H），6.66 (d，J = 8.7 Hz，1H），1.58 (s，2H）。^{13}C NMR（101 MHz，MeOD）δ 155.97，143.46，128.73，115.52，42.49，31.67。经比对，以上数据与文献(徐祥彬, et al. 2009)报道一致，为已知化合物，名为 bisphenol A。

化合物 **3**：浅黄色油状物质。^{1}H NMR（400 MHz，Methanol-d_4）δ 7.07（d，J = 8.5 Hz，1H），6.72（d，J = 8.5 Hz，1H），3.66（s，2H），3.52（s，1H）。^{13}C NMR（101 MHz，CD3OD_SPE）δ 174.58，157.57，131.30，126.32，116.26，52.37，40.89。经比对，以上数据与文献(Shin, et al. 2003)报道一致，为已知化合物，名为 methylp-hydroxyphenylacetate。

化合物 **4**：深黄色油状物质。^{1}H NMR（400 MHz，Methanol-d_4）δ 7.32-7.17（m，6H），7.19（d，J = 4.6 Hz，1H），3.38（dd，J = 8.1，6.7 Hz，3H），2.78（dd，J = 8.1，6.7 Hz，3H），1.90（s，4H），1.89（s，1H）。^{13}C NMR（101 MHz，CD3OD_SPE）δ 173.24，140.50，129.77，129.48，127.34，42.10，36.48，22.50。经比对，以上数据与文献(王航航, et al. 2018)报道一致，为已知化合物，名为 N-phenethylacetamide。

化合物 **5**：黄色油状物质。^{1}H NMR（400 MHz，Methanol-d_4）δ 7.51（dt，J = 7.9，1.0 Hz，1H），7.34（dt，J = 8.2，1.0 Hz，1H），7.16（d，J = 1.0 Hz，1H），7.10（ddd，J = 8.2，7.0，1.2 Hz，1H），7.01（ddd，J = 8.0，7.0，1.1 Hz，1H），3.77（d，J = 0.9 Hz，2H），3.68（s，3H）。^{13}C NMR（101 MHz，MeOD）δ 174.85，138.02，128.57，124.64，122.48，119.88，119.34，112.26，108.51，52.35，31.86。经比对，以上数据与文献(吴洪波, et al. 2019)报道一致，为已知化合物，名为 3-indole-methylethanoate。

化合物 **6**：浅黄色油状物质。^{1}H NMR（400 MHz，Methanol-d_4）δ 7.72（dd，J = 5.7，3.3 Hz，1H），7.61（dd，J = 5.7，3.3 Hz，1H），4.29（t，J = 6.6 Hz，2H），1.72（ddt，J = 9.0，8.0，6.4 Hz，2H），1.52-1.38（m，2H），0.98（t，J = 7.4 Hz，3H）。^{13}C NMR（101 MHz，MeOD）δ 169.31，133.58，132.34，129.87，66.65，31.71，20.25，14.05。经比对，以上数据与文献(Liu, et al. 2018)报道一致，为已知化合物，名为 dibutylphthalate。

化合物 **7**：黄色油状物质。^{1}H NMR（400 MHz，Methanol-d_4）δ 4.26（dd，J = 9.6，6.6 Hz，1H），3.85（dd，J = 9.5，5.4 Hz，1H），3.64 – 3.44（m，2H），2.07-1.97（m，1H），2.01-1.86（m，2H），1.78（dtd，J = 8.6，6.6，4.0 Hz，1H），1.68（ddd，J = 13.5，9.5，5.5 Hz，1H），1.57（ddd，J = 13.8，8.5，5.5 Hz，1H），0.98（dd，J = 11.9，6.5 Hz，6H）。^{13}C NMR（101 MHz，MeOD）δ 171.62，169.07，59.33，57.09，46.71，43.63，29.91，25.52，23.33，23.06，21.93。经比对，以上数据与文献(彭坤, et al. 2015)报道一致，为已知化合物，名为 cyclo(D-Pro-L-Leu)。

化合物 **8**：淡黄色针状晶体。^{1}H NMR（400 MHz，Methanol-d_4）δ 4.84（s，3H），4.24（dd，J = 9.9，6.4 Hz，1H），3.34-3.28（m，1H），2.39-2.31（m，1H），1.91（s，2H），1.89（ddd，J = 11.5，8.7，4.4 Hz，2H），1.65-1.55（m，1H），1.03-0.91（m，7H）。^{13}C NMR（101 MHz，MeOD）δ 171.58，167.91，63.44，59.73，46.76，40.95，30.29，26.03，22.87，15.65，11.60。经比对，以上数据与文献(Hwang, et al. 2017)报道一致，为已知化合物，名为 Cyclo-(D-ProL-Ile)。

化合物 **9**：淡黄色油状晶体。^{1}H NMR（400 MHz，Methanol-d_4）δ 7.31-7.21（m，4H），7.23（s，1H），4.06（ddd，J = 10.9，6.4，2.0 Hz，1H），3.31（t，J = 1.7 Hz，1H），3.17（dd，J = 5.0，1.8 Hz，2H），1.85-1.74（m，2H）。^{13}C NMR（101 MHz，MeOD）δ 170.92，166.90，137.28，131.05，129.46，128.09，60.06，57.68，45.96，38.24，29.37，22.74。经比对，以上数据与文献(于鑫, et al. 2019)报道一致，为已知化合物，名为 cyclo-(L-Pro-L-Phe)。

化合物 **10**：淡黄色针状晶体。^{1}H NMR（400 MHz，Methanol-d_4）δ 1.05（d，J = 7.0 Hz，1H），1.00-0.93（m，3H）。^{13}C NMR（101 MHz，MeOD）δ 171.28，169.67，61.54，54.37，46.00，33.67，25.29，23.61，21.84，19.31，17.79。经比对，以上数据与文献报道一致(吴双凤, et al. 2020)，为已知化合物，名为 cyclo-(L-Leu-L-Val)。

图2 化合物 **1-10** 的结构

Fig.2 Chemical structures of compounds **1–10**

3.3 单体化合物的抑菌活性

抑菌活性实验证明 0.1 mg·mL^{-1} 浓度时的化合物 **3**，**4**，**5**，**6** 对立枯丝核菌有明显抑制效果；化合物 **7**，**8**，**9** 对板栗疫病菌有明显抑制效果；化合物 **3**，**7** 对假禾谷镰刀菌有明显抑制效果。此外，化合物对5 种人体致病菌均无抑制活性。部分结果如图 3。



图3 单体化合物的抑菌活性

注：从左到右依次是立枯丝核菌，板栗疫病菌，假禾谷镰刀菌，图中数字 1、10 和 18 分别对应化合物 **2**、**6** 和 **7**。

Fig.3 The antibacterial activity of compounds

Note：From left to right, it is shown as follows *Rhizoctonia solani*, *Cryphonectria parasitica*, *Fusarium pseudograminearum*. Numbers 1, 10, and 18 correspond to compounds **2**, **6**, and **7**, respectively.

4. 结论

本研究对海洋链霉菌 *Streptomyces sporoverrucosus* 33510 进行抑菌活性检测，发现此菌株对多种植物致病菌有明显的抑制效果。在其次级代谢产物中共分离得到 10 个单体化合物，有 8 个化合物为首次从该菌中分离得到。通过抑菌活性实验证明 0.1 mg·mL^{-1} 浓度时的部分化合物对植物致病菌有明显抑制效果。证明了 *Streptomyces sporoverrucosus* 33510 菌株有作为抑菌

药物研发的潜力，同时丰富了该菌次级代谢产物的多样性。

参考文献 References

刘涛, 李占林, 王宇, 等. 2012. 海洋来源真菌 Penicillium sacculum 次级代谢产物的研究. 中国药学杂志[J]. 47(08):577-580. LIU TAO, LI ZHANLIN, WANG YU, et al. Study on the Secondary Metabolites of Marine-Derived Fungus Penicillium sacculum. Chinese Pharmaceutical Journal[J]. 47(08):577-580.

彭坤, 苏瑞强, 张改云, 等. 2015. 深海放线菌 Micrococcus sp.R21 的次生代谢产物研究. 中国中药杂志[J]. 40(12):2367-2371. PENG KUN, SU RUIQIANG, ZHANG GAIYUN, et al. Secondary metabolites from a deep-sea-derived actinomycete Micrococcus sp.R21. China Journal of Chinese Materia Medica[J]. 40(12):2367-2371.

吴洪波, 陈林, 吕海宁, 等. 2019. 炭团木霉 Trichoderma hypoxylon 中一个新倍半萜. 菌物学报[J]. 38(04):533-538. EU HONGBO, CHEN LIN, LU HAINING, et al. 2019. Anew sesquiterpenoid from Trichoderma hypoxylon. Mycosystema[J]. 38(04):533-538.

吴双凤, 赵益铭, 董冰, 等. 2020. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体中环二肽类化合物的分离与鉴定. 沈阳药科大学学报[J]. 37(03):236-239. WU SHUANGFENG, ZHAO YIMING, DONG BING, et al. 2020. lsolation and identification of cyclo-dipeptide compounds from Paecilomyces hepiali mycelium. Journal of Shenyang Pharmaceutical University[J]. 37(03):236-239.

徐祥彬, 赖童飞, 景云飞, 等. 2009. 山西壶瓶枣缩果病病原菌分离和鉴定. 植物病理学报[J]. 39(03):225-230. XU XIANGBIN, LAITONGFEI, JINGYUNFEI, et al. 2009. lsolation and identification of the pathogens of jujube(Zizyphus jujuba cv. Huping) fruit shrink disease in Shanxi. Acta Phytopathologica Sinica [J]. 39(03):225-230.

于鑫, 韦霞, 冯婵, et al. 2019. 海洋放线菌 Streptomyces novaecaesareae 次生代谢产物. 中山大学学报(自然科学版)[J]. 58(03):63-70. YU XIN, WEI XIA, FENG CHAN, et al. 2019. Secondary metabolites from the marine actinomycete Streptomycesnovaecaesareae. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni[J].58(03):63-70.

王航航, 李刚, 彭晓娉, et al. 2018. 狭叶十大功劳内生真菌 Colletotrichum fioriniae F18 的次级代谢产物研究. 药学学报[J]. 53(11):1862-1867. WANG HANGHANG, LI GANG, PENG XIAOPIN, et al. 2018. Secondary metabolites from Colletotrichum fioriniae F18, an endophytic fungus isolated from the medicinal plant Mahonia fortunei. Acta Pharmaceutica Sinica[J]. 53(11):1862-1867.

BI YH, and YU ZG. 2016. Diterpenoids from Streptomyces sp. SN194 and Their Antifungal Activity against Botrytis cinerea. Journal of Agricultural & Food Chemistry. [J]. 64(45):8525–8529.

BLUNT J W, COPP BR, KEYZERS R A, et al. 2021. Marine natural products. Natural Product Reports. [J]. 38(2):362-413.

HWANG J T, JANG H J, JIN H K, et al. 2017. Lactococcus lactis KR-050L inhibit IL-6/STAT3 activation. Journal of Applied Microbiology. [J]. 122(5):1412-1422.

JENSEN P R, and FENICAL W. 1994. Strategies for the Discovery of Secondary Metabolites from Marine Bacteria: Ecological Perspectives. Annual Review of Microbiology. [J]. 4(1):559-584.

JIANG YI, JUTTA W, XU LIHUA, et al. 2007. Marine actinobacteria, an important source of novel secondary metabolites with bioactivities. Chinese Journal of Antibiotics. [J]. 32(12):711-722.

LIU XIN, YIN CHENGLE, CAO YUE, et al. 2018. Chemical constituents from Gueldenstaedtia verna and their anti-inflammatory activity. Natural Product Research. [J]. 32(10):1145-1149.

SHIN J, SEO Y, LEE H S, et al. 2003. A new cyclic peptide from a marine-derived bacterium of the genus Nocardiopsis. Journal of Natural Products. [J]. 66(6):883-884.